

Parámetros estadísticos que respaldan la calidad de un ensayo HTS a lo largo de sus etapas: GPCR orexigénico como diana.

Irene González González^{1,2*}, Ana Isabel Sanz²

1 Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2** Lugar de realización del trabajo, opcional.

Resumen

High throughput screening (HTS) es una de las fases más tempranas en el proceso de descubrimiento de un fármaco después de la elección-validación del target, en la que se busca, compuestos activos para dicha diana farmacológica, procedentes de un banco de compuestos sintéticos cuidadosamente seleccionados.

Dada la importancia de esta fase, llevan un respaldo de calidad a lo largo de las distintas fases, desde el diseño del ensayo, la fase de adaptación o Set-up, HTS primario, hasta confirmación y dosis- respuesta. Parámetros estadísticos van a ser indicadores de la capacidad de los ensayos diseñados para identificar HITs con precisión, el Factor Z es uno de los más significativos, junto con la CV y la S/B que van a definir el performance del ensayo. Gracias a herramientas informáticas, se analizan estadísticamente los datos y se obtienen gráficas donde se aprecia con claridad los resultados de los ensayos y se sacan conclusiones.

Palabras clave: ensayo bioquímico; adaptación del ensayo; factor Z; HTS performance; HIT.

Cita: González I, Sanz A I (2013) Parámetros estadísticos que respaldan la calidad de un ensayo HTS a lo largo de sus etapas: GPCR orexigénico como diana. *Dianas* 2(2): e20130908. ISSN 1886-8746 journal.dianas.20130908 URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 24 de junio de 2013

Copyright: © 2013 González y Sanz. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es_ES

***E-mail:** ireneggdf@gmail.com



Introducción

El HTS actualmente juega un papel fundamental en el desarrollo de nuevos fármacos, ya que permite ensayar un gran número de compuestos químicos con diferente actividad biológica y sobre diferentes dianas bioquímicas.

Concretamente en el centro de investigación básica de GSK Tres Cantos, disponen de una biblioteca de dos millones de compuestos de los que se espera obtener potenciales drogas para las diversas dianas estudiadas.

La fase de identificación de posibles moléculas farmacológicas o compuestos exitosos, a los que llamaremos HITs, se compone a su vez de las siguientes etapas.

Validación de la diana

Una de las premisas principales para poder llevar a cabo un buen ensayo HTS y obtener un buen performance de éste, es conocer a fondo la diana a ensayar apoyándose en la bibliografía existente y en trabajos de investigación internos de la compañía que conduzcan a una buena validación del target.

El conocimiento de la diana en algunos casos ayuda a acotar y dirigirnos hacia un grupo concreto de compuestos para testar, a los que se denominan sets y de los que cada vez hay más para focalizar los ensayos de HTS (bromodominio set, quinasa set, etc.).

La dianas más ensayadas en HTS han sido: GPCR, Canales iónicos, Receptores nucleares y Proteinkinásas, decimos que son dianas dragables, es decir, se conoce su mecanismo biomolecular detalladamente, por lo que se conocen más diseños de ensayos y por tanto, existe una alta probabilidad de sacar resultados útiles y satisfactorios.

En cambio existen dianas como interacción Proteína- proteína, interesantes también desde el punto de vista terapéutico, el problema es que actualmente se siguen investigando, porque no se conoce con exactitud su mecanismo biomolecular, lo que limita el diseño de un ensayo adecuado.

Desarrollo del ensayo

Una vez validada la diana se pasa al diseño del ensayo en poyata de laboratorio, en el departamento Biological Reagents & Assay Development (BRAD). Ellos deben tener claro la naturaleza del target y de la respuesta que se va a medir, para hacer así una buena elección de la tecnología a utilizar capaz de detectar activos y obtener así ensayos robustos. Una vez completado este trabajo, se genera un documento llamado AESOP (Assay Electronic Source of Protocols), donde se recoge de forma específica la diana, área terapéutica en la que está involucrada, reactivos, volúmenes, tiempo de incubación, etc. Es importante destacar aquí que estos ensayos se hacen en unas placas que contienen 384 pocillos cuya máxima capacidad es de 80ul, esto permite hacer 384 experimentos por cada placa de una sola vez.

SET-UP o puesta a punto del ensayo a gran escala.

Este es el punto en el que empieza a trabajar el departamento de screening & compound profiling (SCP) que será el que complete toda la campaña de HTS.

Una vez diseñado el ensayo, pasamos a la fase de adaptación y optimización del ensayo desde 384 a 1536. Se trata de reproducir el ensayo que viene descrito en el AESOP y adaptándolo a las plataformas robotizadas y al formato de 1536, asegurando una buena calidad y rendimiento del ensayo respetando las características biológicas.

Debido a las dificultades tecnológicas ante las que nos podemos encontrar en el HTS al pasar a gran escala, hay ciertos aspectos del AESOP que exigen ser modificados:

Parameter	Bench top	HTS
Protocol	May be complex with numerous steps, aspirations, washes	Few (5–10) steps, simple operations, addition only preferred
Assay volume	0.1 ml to 1 ml	<1 µl ^a to 100 µl
Reagents	Quantity often limited, batch variation acceptable, may be unstable	Sufficient quantity, single batch, must be stable over prolonged period
Reagent handling	Manual	Robotic
Variables	Many—for example, time, substrate/ligand concentration, compound, cell type	Compound ^b , compound concentration
Assay container	Varied—tube, slide, microtiter plate, Petri dish, cuvette, animal	Microtiter plate
Time of measurement	Milliseconds to months Measurements as endpoint, multiple time points, or continuous	Minutes to hours Measurements typically endpoint, but also pre-read and kinetic

Tabla 1.- Se enumeran las variables entre el ensayo a pequeña escala y el HTS, que exigen la adaptación del ensayo.

A grandes rasgos, para tener un ensayo “robusto” debe reunir una serie de características como:

- Obtener un buen funcionamiento y comportamiento biológico basándonos en los siguientes parámetros estadísticos: Z', CV, S/B, corroborando que están dentro de los límites prefijados en base a estudios estadísticos.
- Alto rendimiento (ensayar de 100000-300000 compounds/day)
- Sensibilidad (capacidad de detectar compuestos poco potentes)
- Minimizar costes, por ejemplo reduciendo al máximo el volumen de reactivos.

Finalmente y una vez considerado el ensayo tiene un buen performance y una buena calidad, pasará a la fase de HTS propiamente dicha.

GPCR involucrado en procesos de anorexia, ensayo HTS

Materiales y métodos de laboratorio

Microplacas de 384 pocillos, microplacas de 1536 (columnas 11 y 12 Low control; columnas 35,36 High control), pipeta multicanal para dispensar las dosis manualmente, Pipetus®- akku.

Multidrop Combi NL (Thermo Scientific): dispensador de volúmenes de entre 50nl-50ul en placas de 96, 384 y 1536 pocillos.

ECHO®: Robot dispensador del orden de nanolitros (hasta 5nl) a través de ultrasonido.

Viewlux uHTS Microplate Imager®: el sistema posee la capacidad de detectar luminiscencia, fluorescencia, fluorescencia polarizada y absorbancia.

En el área de cultivos celular: PBS, Medio específico de células CHO, TripleE, Tifflas de 175cm².

Reactivos: Revelador (Emerald + Galactone + Cell assay buffer), ligando, pull células CHO, DMSO, library compounds

Programas y aplicaciones informáticas para el análisis de datos

Microsoft office Excel 2000, Herramientas informáticas para el análisis de bajo número de datos.

ActivityBase, es el eje central de todos los programas y aplicaciones de análisis de datos. Es capaz de calcular las actividades de miles de compuestos al mismo tiempo. Además, se le programan diferentes settings que nos ayudan a acotar los resultados de nuestro ensayo dentro del rango que hayamos predeterminado.

Spotfire, plataforma de software que permite visualizar gran número de datos y relacionarlos.

Wallace, permite generar y explorar diferentes protocolos y visualización de resultados procedentes del lector Viewlux.

SODA, herramienta que nos permite ver en tiempo real la calidad de nuestro ensayo, mostrando los valores de Z' de cada placa y los CV.

El ensayo HTS debe diseñarse con el objetivo final de lograr discriminar con precisión un HIT de un compuesto NO-HIT. La precisión es necesaria ya que se trabaja con volúmenes muy pequeños (ul y nl), los compuestos de la librería se suelen testar una sola vez y el ensayo requiere un coste elevado.

Para evaluar el performance y calidad del ensayo, se llevan a cabo análisis estadísticos poblacionales, asumiendo que los datos siguen una distribución Normal y se miden parámetros como:

- **Mean**
- **SD**
- $S/B = \frac{\text{mean signal}}{\text{mean background}}$ - se conoce como la ventana del ensayo, representa la separación entre C1 (control del 100% de actividad biológica) y (control del 0% de actividad biológica), pero no tiene en cuenta la variabilidad.
- **%CV=100× SD/Mean**; El **coeficiente de variación** es un buen parámetro representativo de la variabilidad intra-placa.

Ninguno de estos parámetros aislados, definen la calidad del ensayo, existe otro parámetro que engloba tanto la ventana como la variabilidad:

- **Coeficiente de ventana:** $Z' = 1 - \frac{(3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-})}{|\mu_{c+} - \mu_{c-}|}$

Este parámetro representa la capacidad de identificar un Hit con unas condiciones y screening definidos. Se considera un buen coeficiente de ventana $Z' \geq 0.4$.

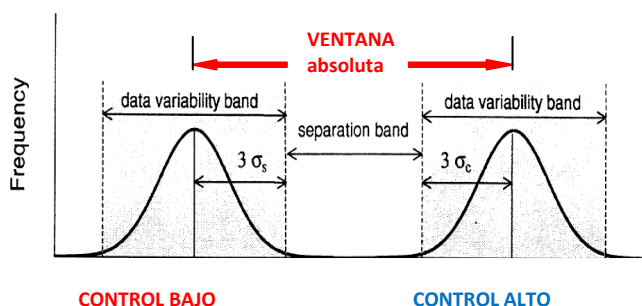


Figura 1.- Representación gráfica del concepto de Ventana de un ensayo y variabilidad entre los datos. El objetivo es partir de una amplia ventana absoluta, acompañado de una baja variabilidad entre los pocillos de cada control, de esta forma se obtiene una amplia separación de banda, lo que indicaría una buena calidad y fiabilidad en la discriminación de HITs.

Etapas y desarrollo de un ensayo celular de HTS: GPCR orexigénico

La diana se trata de un GPCR orexigénico. Se buscan agonistas para tratamiento de anorexia transitoria ligada a ciertas patologías (por ejemplo pacientes oncológicos tratados con quimioterapia). La técnica que vamos a utilizar para detectar nuestra señal de activación del receptor va a ser luminiscencia.

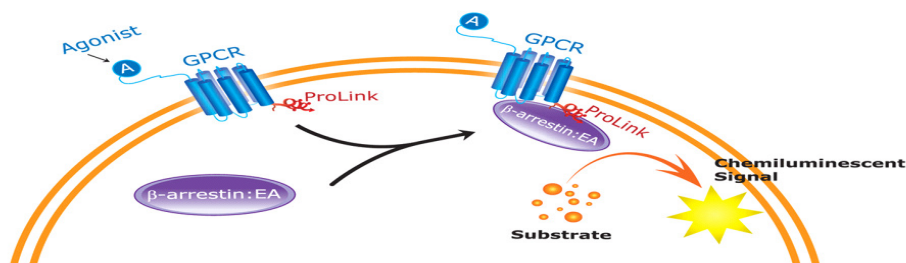


Figura 2.- Como se observa en la figura, la unión del ligando agonista va a generar una consecuente actuación de β -arrestina, la cual interviene en el proceso de internalización del receptor, manteniendo así un equilibrio en la vía de señalización. El GPCR está unido a una porción de β -galactosidasa (Pro Link) y β -arrestina está fusionada con la porción complementaria llamada aceptor ligado a β -arrestina. Tras la activación del receptor, se fusionan el aceptor ligado a β -arrestina con el fragmento Pro-Link, lo que genera la degradación de un sustrato que emitirá luz.

Los compuestos que resulten agonistas, al unirse a este receptor, generarán consecuentemente señal en forma de luz.

Set- up (tiempo aproximado 2 semanas):

Se estudia la farmacología del ensayo con un *tool compound* (compuesto usado de referencia, ya que se conoce su actividad en la diana a ensayar) en este caso llamado *ligando P* y se ve si el compuesto tiene la potencia especificada en el AESOP. Una vez corroborado, lo usamos como high control (máxima actividad) a su EC80 a lo largo de todo el ensayo.

Adaptación a la robótica, diseño protocolo lectura

En los software de las plataformas robóticas diseñamos el ensayo siguiendo los pasos que vienen en el AESOP y aplicando las modificaciones, si las hubiera, que se han determinado en el Set-up.

A continuación, se genera un nuevo protocolo de lectura, en este caso en el lector viewlux (adaptado a la plataforma) con el nombre de nuestro ensayo. Se especifica la tecnología a utilizar (luminiscencia), el tipo de placa, los filtros necesarios, el tiempo de lectura por placa, el número de lecturas y los intervalos entre éstas si los hubiese. Se va adaptando y mejorando en la medida de lo posible el protocolo en función de los factores Z que vamos obteniendo con las modificaciones introducidas.



Figura 3.- Viewlux disponible en Factory TC.

Performance y calidad del ensayo

Se hacen varias placas High/Low (QC) de 1536 y estudiamos la Z' , CV y S/B de éstas, para observar el performance de nuestro ensayo:



Figura 4.- Ejemplo de un ensayo de placa High & Low y protocolo a seguir para hacerlo.

Se van estudiando de nuevo haciendo H/L, variantes como: Distintos tiempos de pre-incubación (célula-ligando), volúmenes dispensados de reactivo, tiempo de incubación con revelador previo a la primera lectura, dispensación en agitación de reactivos, número de pases de células dispensadas (24h, 48h, etc.).

El objetivo es ir viendo cómo afectan éstas variantes a los parámetros que definen la calidad del ensayo y poder así ir optimizándolo y obtener resultados de performance y calidad satisfactorios.

Estabilidad de reactivos

Se dedica un día de ensayo para llevar a cabo H/L a $t=1h$, $t=2h$, $t=3h$, etc.

Se va viendo de nuevo cómo varía la Z' , CV y S/B y se va estudiando consecuentemente la viabilidad de los reactivos RT cara al HTS.

Tolerancia al DMSO

La mayoría de los compuestos de la librería van disueltos en DMSO, por ello es necesario saber cómo interfiere en la señal de nuestro ensayo. Para ello se hacen dosis de DMSO a diferentes concentraciones y analizamos la señal, en la mayoría de los ensayos se tolera un máximo de 1% DMSO.

Se dispensa el DMSO con la pipeta multicanal partiendo de cuatro concentraciones diferentes y por triplicado cada una de ellas, en total se ocupa desde la columna 1 a 12 y se hacen diluciones 1/2 ó 1/3 siete puntos.

Validación (una semana):

El set de validación son un conjunto de 10000 compuestos seleccionados con un respaldo matemático de matrices y ClogP y son representativos de los 2000000 de la colección. Se predice el comportamiento del ensayo frente a compuestos antes de comenzar la fase de primario donde se van a testar los 2M de compuestos.

Se ensaya la diana con el set de validación: se hacen 7 placas 1536 de compuestos a concentración 10uM por triplicado.

Se analizan los datos y obtenemos parámetros como el **cut-off** (3SD), el cual nos va a marcar el porcentaje de actividad a partir del cual consideramos que los compuestos son activos. El **Hit-Rate**, éste parámetro indica el porcentaje de activos del total de compuestos ensayados (<2%).

HTS Primario (tiempo aproximado 3 semanas):

Se pueden testar: *Focuset* (existen conjuntos de compuestos que comparten características químicas que se sabe poseen actividad sobre un tipo de diana determinada) ó *Diversity* (se ensayan todos los compuestos de la librería).

En el primario, se ensaya cada compuesto una sola vez (single sot). Se ensayan de 100.000-300.000 compuestos diarios (100 placas de compuestos/día), Este elevado rendimiento se consigue gracias a la adaptación a plataformas y a los trabajadores del laboratorio.

A lo largo de las tres semanas de desarrollo del primario, se ensayan de 6 a 8 placas de QC (Quality Control) intercaladas para controlar el performance del ensayo. Generalmente se ensayan dos al comienzo, dos en mitad del proceso y dos al final de éste, sin interrumpir en ningún caso los tiempos de incubación y/o lectura de las placas de compuestos que se están ensayando en la plataforma en ese momento.

Protocolo: en las placas 1536 de compuestos a ensayar, se dispensará 50nl de ligando a su EC80 en las columnas 35 y 36 (High control), 5ul de células full plate y dejamos 1,30 hora de preincubación. Transcurrido este tiempo se añaden 2ul de reactivo revelador full plate y se deja de nuevo 1h de incubación, finalmente se van leyendo las placas en el viewlux. Todo este proceso se acopla en las plataformas robotizadas, de forma que se ajustan los tiempos entre placas, para obtener un alto rendimiento.

Se estudia el cut-off y el Hit-rate como parámetros característicos de esta fase (sin olvidar la Z, CV y S/B que se sigue valorando a lo largo de todas las placas y etapas para asegurar que se mantiene un buen performance).

Los compuestos positivos (Hits primarios), pasan al departamento químico (Computational and Structural Sciences), donde se hace un segundo cribado atendiendo a características fisicoquímicas como: tamaño molecular, lipofilia, familias de compuestos, etc.

Tras este filtro químico, ≤ 20000 compuestos pasan a confirmación.

Confirmación (una semana):

Las placas de confirmación son generadas por Smetech haciendo un "cherry pick", se seleccionan de la colección los compuestos que han resultado positivos en la fase anterior y se dispensan en placas de 1536.

En confirmación se ensayan los compuestos por duplicado y se estudia la correlación de los datos procedentes de las señales entre ambas copias. Se estudia también el Coeficiente de confirmación ó Rate de confirmación (aceptable ≥ 60 -70%), que es el rango de correlación entre la media de los resultados de confirmación frente a los datos del HTS primario.

Pueden pasar a dosis- respuesta ≤ 4000 compuestos, en ocasiones es necesario un nuevo filtro químico si obtenemos más de 4000 HITs en confirmación.

Dosis- respuesta:

Se ensayan los compuestos procedentes de la confirmación por duplicado, partiendo de una concentración 100uM y se hacen once diluciones 1/3 seriadas.

Se encarga al departamento de Compound Bank que dispense con el ECHO placas 1536 y ellos hacen también la dosis de los compuestos que han progresado

Se obtienen las potencias (pXC50) de cada compuesto y se ve la correlación entre ambas copias. En función de la futura vía de administración de los fármacos resultantes de la adaptación galénica de éstos compuestos, se acepta una mayor o menor potencia de ellos para superar esta fase final del screening. Pero en un principio, generalmente compuestos con una pXEC50 ≤ 5 , se consideran compuestos muy poco potentes y salvo excepciones justificadas, no progresarán.

El objetivo es encontrar XC50 del orden de nM.

Resultados:

Validación:

Al exportar los datos brutos obtenidos en los lectores (Viewlux) del laboratorio a Activity Base, éste procesa los datos y se obtienen gráficas.

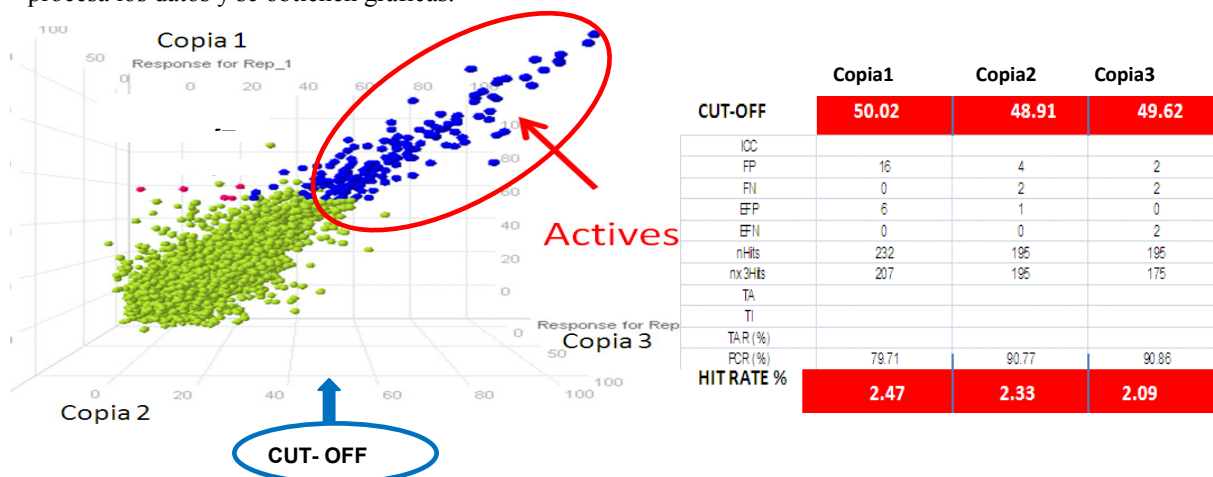


Figura 5.-Los compuestos activos en las tres copias, aparecen en azul. El cut-off es de 49,5 %, los compuestos con un porcentaje de actividad ≥ 49.5 se consideran activos (rodeados con un círculo rojo). Por otro lado el Hit Rate en este caso es bastante bueno (<5), nos indica que hay un 2.30% de compuestos activos.

HTS primario:

Tras haber ensayado nuestra diana con los **180000** compuestos a 10uM, los datos obtenidos se procesan y se visualizan, como se observa en la siguiente gráfica, se ajustan a una distribución Normal:

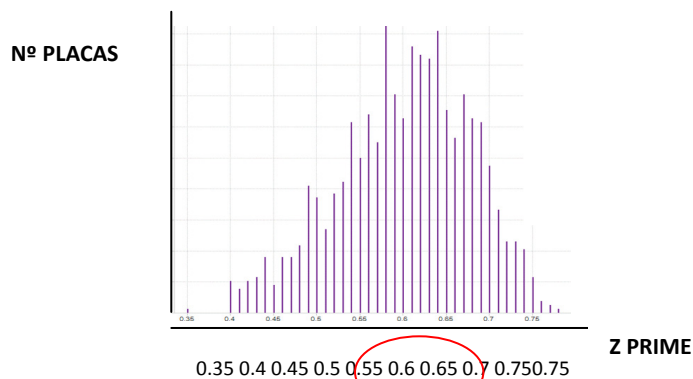


Figura 6.- Existe una buena distribución de Z' en las placas, se mantiene un buen performance del ensayo.

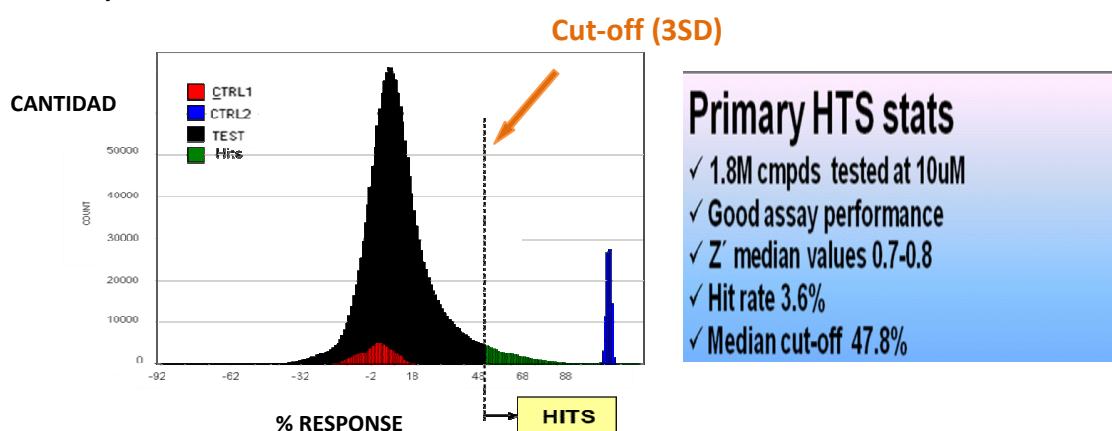


Figura 7.- La mayoría de las muestras se distribuyen alrededor del 0% de la respuesta que se espera obtener de los compuestos, es decir, gran parte de ellos no son activos en la diana, en este caso no se comportarían como agonistas del GPCR orexigénico. La media de respuesta está cercana a cero.

3SD de la media marcan el cut-off= 47.8% (mínima actividad a partir de la cual consideramos HIT un compuesto). El HIT-RATE es algo elevado (3.6%), se obtienen 64800 positivos, pero tras el filtro químico se disminuirá el número de compuestos que pasarán a confirmación.

Confirmación:

Tras mandar los HITs procedentes del primario al departamento de Química médica, donde se hace el filtro químico, sólo progresaron a confirmación 20.000 compuestos, los cuales se ensayaron de nuevo pero esta vez por duplicado a 10uM y se estudia la correlación entre ambas copias.

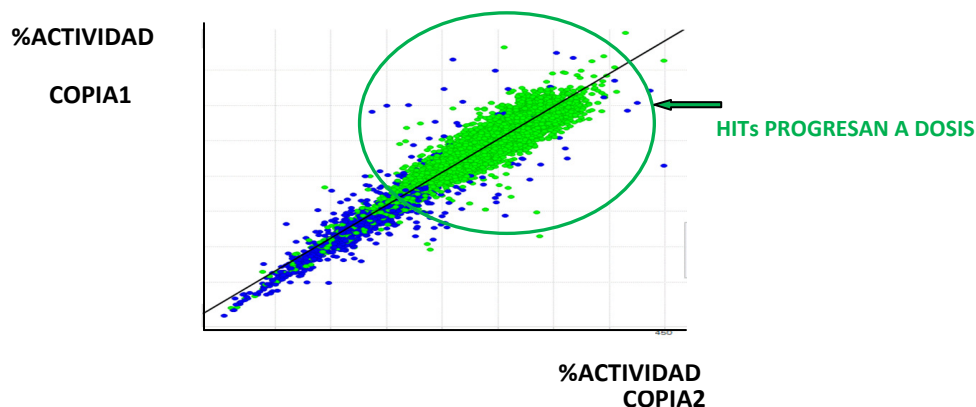


Figura 8.- Los compuestos que superan el cut-off en ambas copias (verdes) progresan a dosis, progresaron 3986 compuestos.

Dosis- respuesta:

Se estudian las diferentes potencias y vemos de nuevo la correlación entre ambas copias. Finalmente se seleccionarán los compuestos con una pXC_{50} (potencia) ≥ 5 , equivale a 10U μ m se considera una buena potencia, compuestos cuya potencia sea \geq a ésta, progresaran hacia estudios posteriores.

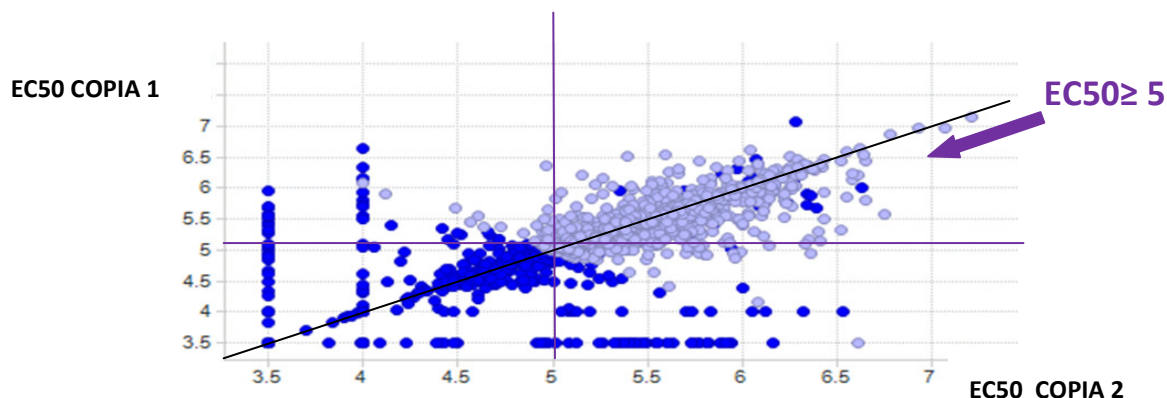


Figura 9.- En este caso se observa una buena correlación entre copias. Más de **1102** compuestos tienen $XEC_{50} \geq 5$.

Conclusión

La validación del proceso HTS es un desafío debido a las altas fuentes de variabilidad de cada ensayo y el comportamiento de los reactivos biológicos. Por ello todas las fases de éste proceso van acompañadas de análisis estadísticos que aseguran la calidad de éstos y la capacidad de detección de hits, de esta forma se desarrollan ensayos robustos y de alta sensibilidad para HTS, haciendo posible el screening de los compuestos de la colección con un buen performance.

Se consigue detectar así de forma rápida (2 meses aproximadamente, si no se complica ninguna de las fases) compuestos con actividad y potencia en la diana ensayada , en este caso compuestos agonistas del GPCR orexigénico. Estos compuestos, tras haber superado la fase de Dosis- respuesta, pasarán a ensayos de modificaciones químicas (introducción de grupos funcionales ó modificación de los ya existentes), citotoxicidad y selectividad, antes de pasar a la fase preclínica.

Agradecimientos

Agradecer a todos los trabajadores de GSK la ayuda, colaboración y empeño en la enseñanza de todos los conocimientos que he adquirido en estos tres meses en esta empresa y especialmente a mi tutora Ana Isabel Sanz, Sergio Senar, M^a Ángeles Vivas y a Alberto Bejarano Prudencio, alumno del Máster de Dianas 2011/2012.

Bibliografía

1. Steven, M. P., S.M., Daniel et al. 2010. How to improve R & D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews Drug Discovery* 9:203-214.
2. Pereira, D. A and J. A. Williams. 2007. Origin and evolution of high- throughput screening. *British Journal of Pharmacology*, 152:53-56.
3. Zhang, J. and D. Y. Thomas. 1999. A Simple Statical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assay. *Journal of Biomolecular Screening*. 4(2):67-73.
4. Inglese, J., R. L. Jhonson., et al. 2007. High-throughput screening assay for the identification of chemical probes. *Nature Chemical Biology*. 3(8):466-478.
5. Coma, I., L. Clark. et al. 2009. Process Validation and Screening Reproducibility in High- throughput screening. *Journal of Biomolecular Screening*. 66-76. DOI: 101177087057108326664.
6. Macarrón, R and R. P. Hertzberg. 2009. Design and Implementation of High- Throughput Screening. In: Janzen, W. P., P. Bernasconi, editors. *High-throughput Screening, Methods and Protocols*. 2nd edition. Humana Press. 26.